107-113

动 物 学 研 究 1998, 19 (2): 107—113　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

恒河猴肺内 CGRP 及 CGRP mRNA 免疫组织化学和原位杂交的研究

张远强　武胜昔
(第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室，解剖学教研室　西安　710032)
许若军　张舒华
(香港大学动物学系　香港)

摘要　本实验采用免疫组织化学 ABC-GDN 法和地高辛标记寡核苷酸探针原位杂交技术，研究了降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)及其 mRNA 在恒河猴肺内的表达。结果显示 CGRP 分布于恒河猴肺内各级支气管粘膜上皮的神经内分泌细胞(neuroendocrine cells, NEC)和神经上皮样小体(neuroepithelia bodies, NEB)中。CGRP 杂交阳性细胞的分布与免疫组织化学的结果相同。CGRP mRNA 杂交信号均匀分布于整个细胞质，而 CGRP 免疫反应物仅在神经内分泌细胞的基部更明显，说明肽合成后聚集在基部。免疫组织化学还发现走行于肺内支气管和血管外周的神经纤维亦呈 CGRP-IR 阳性。相邻切片法还证实，CGRP 与 5-羟色胺(5-HT)共存于 NEC 和 NEB 中，说明二者在功能上可能具有相关性。

关键词　降钙素基因相关肽，5-羟色胺，免疫组织化学，原位杂交，恒河猴，肺
中图分类号　R392.1，Q959.848

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种由 37 个氨基酸残基组成的多肽，其 N-端有 1 个 2.7 双硫键，C-端有 1 个酰胺基。CGRP 的编码基因与降钙素(calcitonin, CT)相同，CT 基因可产生两种不同的 mRNA，分别合成 CT 和 CGRP。人 CGRP (hCGRP) 和大鼠 CGRP (rCGRP) 在 1, 3, 25, 35 位氨基酸不同(Amara 等, 1982)。CGRP 广泛分布于神经元和内分泌细胞中。HPLC 和 RIA 已证实某些哺乳类动物肺中含有 CGRP，免疫组织化学也已确定 CGRP 位于肺神经内分泌细胞(pulmonary neuroendocrine cells, PNEC)中，且在气道粘膜下层、肌层间质及血管外周也有 CGRP 阳性的神经纤维分布 (Cadieux 等, 1986; Keith 等, 1988, 1990; 张远强, 1993)。生理学实验证实 CGRP 有较强的舒张肺血管作用，并影响某些生物活性物质的释放。其作为重要的神经递质和调质，对于局部肺循环和呼吸功能具有重要的调节意义(Schifter 等, 1993)。至今尚未见到有关 CGRP 在恒河猴 (*Macaca mulatta*) 肺分布的报道。本文利用免疫组织化学 ABC 法并结合葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵 (GDN) 显色技术，在恒河猴肺连续石蜡切片上，观察了 CGRP 的定位分布及与 5-HT 的共存关系，

本文 1997-01-28 收到，1997-06-02 修回

同时通过地高辛标记 CGRP 寡核苷酸探针进行原位分子杂交，以检测 CGRP mRNA 的表达，并对 CGRP 表达和定位的生理意义进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 免疫组织化学

1.1.1 试剂 免抗 CGRP 为英国 Serotec 公司产品，兔抗 5-HT 系我室生产，二者工作效价均为 1∶4000。生物素标记猪抗兔 IgG（1∶500）及 ABC 试剂，均为丹麦 Dako 公司产品。

1.1.2 标本制备 成年雌性恒河猴 5 只。4%水合氯醛麻醉后，取肺组织经 4℃生理盐水沿支气管灌注冲洗后，入 Bouin 固定液固定 24 h。常规脱水，透明，石蜡包埋。用 Biocut 202 切片机切成 2 μm 厚连续切片，裱贴于涂有 1%铬矾明胶的玻片上，37℃温箱烘干备用。

1.1.3 免疫组织化学程序 按 ABC 法标准染色程序进行（Hsu 等，1981；张远强等，1990)。一抗、二抗和 ABC 复合物分别在室温下孵育过夜，1 h 和 30 min。以上各步骤之间均用 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐水（PBS，pH 7.2)冲洗 15 min（5 min×3)。最后用 GDN 显色液显色 10 min。1%中性红复染 3 min，脱水，透明，DPX 封固。

1.1.4 相邻切片免疫双标记 取相邻切片，滴加以 CGRP 和 5-HT 为一抗的 ABC 免疫组织化学染色。

1.1.5 阴性对照 设空白对照（PBS 替代一抗）和替代对照（正常兔血清替代一抗)。染色结果用 Olympus BH Ⅱ型光学显微镜观察并照相。

1.2 原位杂交

1.2.1 标本制备同免疫组织化学

1.2.2 探针制备及标记 实验用的 CGRP 寡核苷酸探针由 Applied Biosystems 381A DNA 合成仪合成，含 35 个碱基，其序列与已知大鼠脑内 CGRP mRNA 的区段（自第 664 号碱基到第 698 号碱基）互补。CGRP 探针序列为 3′-AACCA GAAGA CCCCT GTACC ATTAC AACAC TGAGT-5′（Amara 等，1985)。用 3′末端标记法及地高辛-11-dUTP（Boehringer 公司产品）进行标记。标记探针置-20℃保存备用。

1.2.3 原位杂交程序（苏慧慈，1994） 室温下，切片经二甲苯脱蜡，梯度酒精入水，4%多聚甲醛固定 20 min，0.1 mol/L 磷酸缓冲液（PB）洗 3 次（5 min×3)。继而用蛋白酶 K（25 μg/ml，0.1 mol/L Tris，0.05 mmol/L EDTA 配制）37℃，15 min。0.1 mol/L PB 洗 2 次（5 min×2)。将切片置于杂交前处理液中（含 0.9%NaCl，1.5%三乙醇胺，0.25%乙酸酐）10 min。0.1 mol/L PB 洗 5 min，然后将 200 μl 杂交液[含 4×SSC 0.6 mol/L NaCl，0.06 mol/L 枸橼酸钠，50%甲酰胺，25%tRNA，10%硫酸苏糖，1×Denhardt（含 0.02%牛血清白蛋白，0.02%菲可 400，0.02%PVPK-30）]及标记探针（0.5 μg/ml）滴加到切片表面。置湿盒孵育 20 h（37℃)；用 2×SSC（室温，10 min）和 1×SSC（55℃，10 min×3）冲洗。Buffer Ⅰ（含 0.1 mol/L 马来酸，0.15 mol/L NaCl，pH 7.5）2 min；Buffer Ⅱ（含 1%Blocking Reagent，0.3%Triton X-100）30 min。滴加羊抗地高辛抗血清——碱性磷酸酶（Anti-DIG-AP）结合物（1∶750)，每片 300 μl，室温 5 h。Buffer Ⅰ 15 min×2；BufferⅢ（0.1 mol/L Tris-HCl，0.1 mol/L NaCl，0.05 mol/L $MgCl_2$，pH 9.5）2 min。滴加显色液（NBT 45 μl，BCIP 35 μl 加入 BufferⅢ至 10 ml）避光孵育 12—16 h。Buffer Ⅰ 洗 15 min。梯度酒精脱水，二甲苯透明封片，光镜观察照相。

1.2.4　对照　a. 用预杂交液替代杂交液；b. 在杂交液中不加入 CGRP 寡核苷酸探针，而加入无关 DNA 探针，与肺组织切片杂交；c. 孵育切片于 10 μg / ml RNA 酶溶液中，以标准酯酸盐溶液配制，37℃ 15 min。

2　实验结果

2.1 免疫组织化学

本实验所设阴性对照均未见特异性着色。ABC-GDN 免疫组织化学染色结果显示 CGRP 免疫反应（immunoreactive, IR）阳性的单个神经内分泌细胞（neuroendocrine cells, NEC）和神经上皮样小体（neuroepithelial bodies, NEB）零散分布于恒河猴肺内支气管树的粘膜上皮细胞中。免疫反应物呈蓝黑色均匀分布于胞质中，尤以细胞基部明显，核无色（图 1）。在叶支气管、小支气管、细支气管、终末细支气管、呼吸性细支气管和肺泡导管管壁的粘膜上皮细胞间均有分布（图 1，2）。在叶支气管和小支气管主要为单个的呈 CGRP-IR 阳性的 NEC，位于靠近基膜的粘膜上皮深层，呈卵圆或锥形，但细胞顶端不达及腔面。在细支气管以下，尤其在呼吸性细支气管和肺泡导管主要为聚集成团的呈 CGRP-IR 阳性的 NEB。NEB 通常由 3—15 个柱形或锥形细胞排成一排，与单个 NEC 相反，这些细胞的顶端通常达及腔面（图 1）。在有些 NEB 的基底部可看到呈 CGRP-IR 阳性的神经纤维（图 1）。沿肺内支气管和血管分支走行的神经纤维呈 CGRP-IR 阳性。随着管径变小，CGRP-IR 阳性神经纤维的数量减少。CGRP-IR 阳性神经纤维主要位于支气管和血管外膜中（图 3，4）。在终末细支气管以下，阳性纤维主要位于粘膜上皮下方的结缔组织中。相邻切片法免疫双标记证明多数 NEC 和 NEB 也含有 5-HT 免疫反应物（图 5A，5B）。说明 CGRP 和 5-HT 可共存于 NEC 和 NEB 中。

2.2　原位杂交

原位分子杂交结果显示 CGRP 寡核苷酸探针与其互补的 mRNA 杂交反应阳性产物集中在肺内支气管管壁粘膜的上皮细胞中（图 6）。杂交反应物呈蓝色或紫蓝色颗粒，均匀位于整个细胞胞质中，核区亦被杂交反应阳性物复盖（图 7）。用预杂交液和在杂交液中不加入 CGRP 探针的杂交切片上未见任何特异性着色；RNA 酶预处理后切片亦呈阴性反应。CGRP 杂交阳性细胞的分布与免疫组织化学的结果基本一致，在肺叶支气管、小支气管、细支气管、终末细支气管、呼吸性细支气管和肺泡管管壁的上皮细胞间均可见单个或聚集成团的 CGRP 杂交阳性细胞。杂交阳性细胞呈锥形、圆形、柱形或不规则形，但以锥形居多，数个聚集镶嵌在其他上皮细胞间，位于基膜上，细胞顶端达及腔面，为 NEB；另一些单个 CGRP 杂交阳性细胞，位于粘膜上皮细胞之间，多呈锥形或立方形，为 NEC（图 6）。肺组织中肺泡上皮、血管及间质均呈阴性反应。

3　讨论

免疫组织化学证明 CGRP 存在于恒河猴肺内各级支气管粘膜上皮中的 NEC 和 NEB 中，说明猴肺神经内分泌细胞在翻译水平具有合成 CGRP 的能力。同时原位分子杂交结果表明内分泌细胞含有 CGRP 的基因表达产物 mRNA，这样在产物和基因水平充分证明猴肺各级支气管中的 NEC 和 NEB 能特异性生成 CGRP。CGRP 杂交阳性细胞的分布与免疫组织化学的结果基本一致，但 CGRP mRNA 杂交信号均匀分布于整个胞质，而

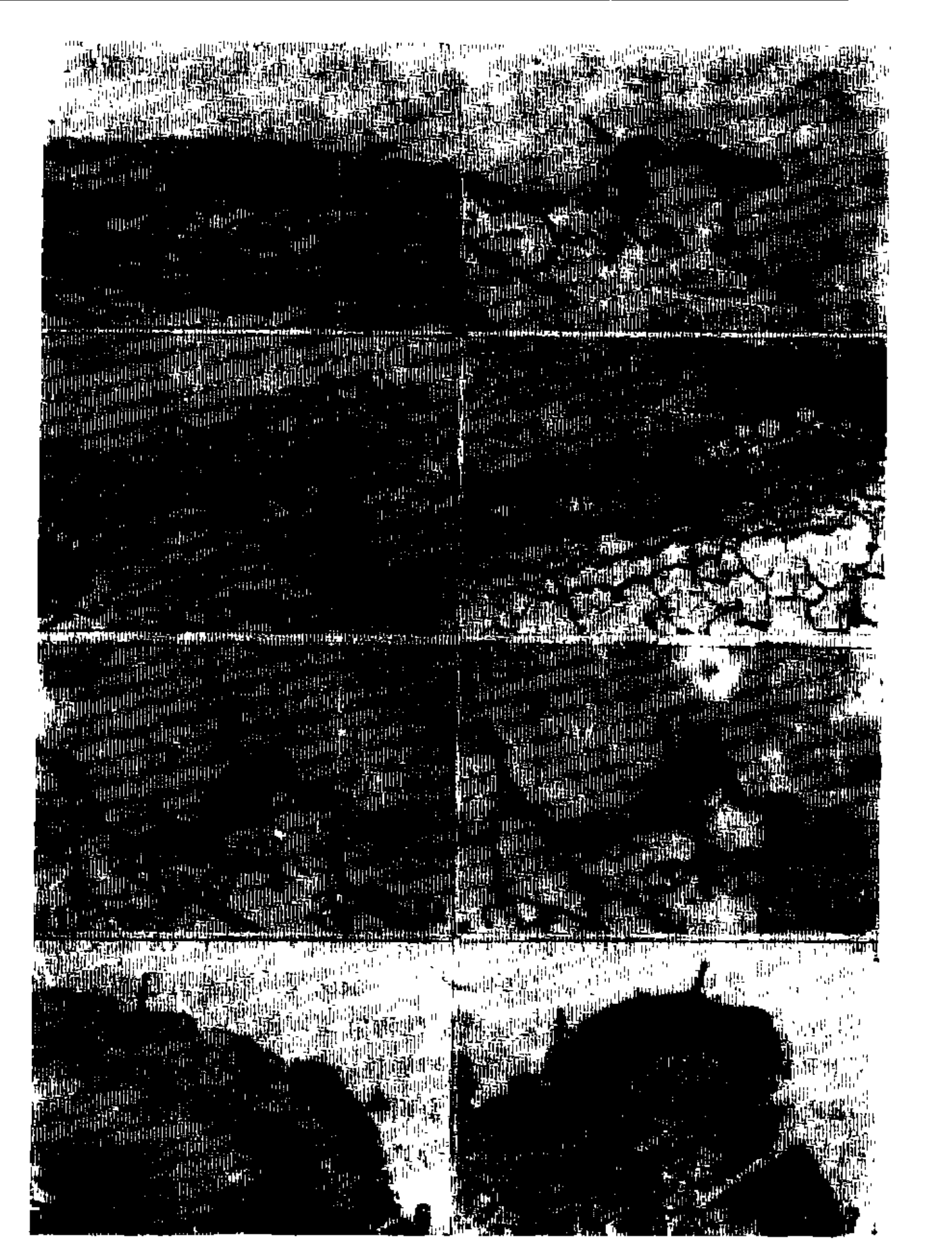


图 1—7 恒河猴肺内 CGRP 及 CGRP mRNA 免疫组织化学和原位杂交的观察结果

Figs. 1–7 The observation on immunohistochemistry and *in situ* hybridization of CGRP and CGRP mRNA in lungs of *Macaca mulatta*

1 肺内支气管粘膜上皮呈CGRP-IR阳性的NEB和NEC，ABC–GDN法（CGRP-IR in NEB and NEC of bronchial epithelium in intrapulmonary bronchi，ABC–GDN method）×450

2 肺泡导管粘膜上皮中呈CGRP-IR阳性的NEB和NEC，ABC–GDN法（CGRP-IR in NEB and NEC of bronchial epithelium in alveolar duct，ABC–GDN method）×450

3. 气管壁中呈CGRP-IR阳性的神经纤维，ABC–GDN法（CGRP-IR nerve fibers in wall of bronchi，ABC–GDN method）×450

4. 血管壁中呈CGRP-IR阳性的神经纤维，ABC–GDN法（CGRP-IR nerve fibers in wall of blood vessel，ABC–GDN method）×450

5 A，B相邻切片分别显示CGRP（A）与5-HT（B）共存于NEB中，ABC-GDN法（Adjacent sections showing the coexistance of CGRP（A）and 5-HT（B）in NEB，ABC-GDN method）×400

6 气管上皮NEC（箭头）和NEB（大箭头）中CGRP mRNA分布，地高辛-CGRP寡核苷酸探针，NBT-BCIP呈色（The distribution of CGRP mRNA containing NEC（arrow）and NEB（large arrow head）of bronchial epithelium，Dig-oligonucleotide probe，developed NBT-BCIP）×300

7. 肺内支气管粘膜上皮中CGRP mRNA（箭头）阳性细胞，地高辛-CGRP寡核苷酸探针，NBT-BCIP呈色（CGRP mRNA positive cells（arrow）of bronchial epithelium in intrapulmonary bronchi，Dig-oligonucleotide probe，developed NBT-BCIP）×450

CGRP-IR 主要位于胞质基部，说明该肽合成后主要聚集在基部。支气管及血管外膜的神经亦呈 CGRP 阳性。这些结果与 Cadieux 等（1986）在大鼠和 Uddman 等（1985）在人、狗、小鼠免疫组织化学观察以及 Keith 等（1991）的原位分子杂交的结果基本一致。现已证明 CGRP 主要由含乙酰胆碱的神经元产生，并与 SP 共存于感觉神经元及纤维中（Gibbins 等，1985）。我们的发现证明了 CGRP 和 5-HT 可共存于同一 NEC 和 NEB 中，说明 CGRP 和 5-HT 在功能上有相互关联性。尽管 CGRP 和 5-HT 共存的意义尚不清楚，但已有证据表明胺类递质可能参与神经内分泌细胞中调节肽的合成、贮存和分泌（张远强，1993；王瑞安等，1997）。双重免疫标记证明 5-HT 还可与蛙皮素（BBS）和生长抑素（SS）共存于恒河猴幼猴肺中的同一 NEB 中（Dayer 等，1985）。生理学实验证明肺内分泌细胞中的 5-HT 水平是随气道中 O_2 和 CO_2 浓度而发生变化，并可能影响 CGRP、BBS 和 SS 的水平（Keith 等，1982）。尽管存在于 NEC 和 NEB 中的 CGRP 的作用不甚清楚，但支配肺血管的 CGRP-IR 神经纤维肯定与肺循环的局部调节有关。现已发现 CGRP 的结合位点在血管的内膜和中膜，部分通过血管内皮细胞的调制，部分通过直接激活中膜平滑肌细胞腺苷酸环化酶而引起血管扩张（Brain 等，1985）。支气管外膜和粘膜上皮下的 CGRP-IR 神经纤维可能具有感觉功能，感受气管气体浓度的变化及有害气体的刺激，直接或间接影响气管平滑肌的收缩与舒张，并改变其管径，调节气体流量。生理学和药理学实验证明 CGRP 有较强的舒张肺血管作用。Martling 等（1988）证实 CGRP 能明显舒张由 5-HT 所引起的肺动脉收缩。CGRP 还可降低由低氧所致的肺循环血压过高及左心室压力（Keith 等，1991）。Tjen-A-Looi 等（1991）还观察到给慢性低氧血症患者连续灌注 CGRP 16 天可明显降低肺循环血压过高。手术切除和化学毁损实验也证明，这些 CGRP-IR 神经纤维的性质是感觉性的，来源于胸椎后根神经节或颞神经节（Martling 等，1988；Zzyzik-Krzeska 等，1991）。

参 考 文 献

王瑞安，张远强，孙 岚，1997. 八肽胆囊收缩素与甲-脑啡肽在EC细胞中的共存及含量的相互关系. 解剖学报，28(2)：210—213.

苏慧慈，1994. 原位杂交. 北京：中国科学技术出版社. 149—150.

张远强，苏慧慈，1990. 葡萄糖氧化酶-二氨基联苯胺-硫酸镍胺法在免疫酶双重染色技术中的应用. 动物学杂志，25(5)：36—38.

张远强，1993. 兔肺降钙素基因相关肽与5-羟色胺共存 第四军医大学学报，14(1)：6—8

Amara S G，Jonas V，Rosenfeld M G *et al*，1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNA encoding different polypeptide products. *Nature*，**298**：240-244.

Amara S G，Arriza J L，Lefe S E *et al*，1985. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*，**229**：1094-1097.

Brain S D，Williams T J，Tippins J R *et al*，1985. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator.

Nature, **313**(1): 125–135.

Cadieux A, Springall D R, Mulderry P R *et al*, 1986. Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. *Neuroscience*, **19**: 605–627.

Dayer A M, DeMey J, Will J A, 1985. Localization of somatostatin, bombesin- and serotonin-like immunoreactivity in the lung of fetal rhesus monkey. *Cell Tissue Res.*, **239**(3): 621–625

Gibbins I L, Furness J B, Costa M *et al*, 1985. Colocalization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci. Lett.*, **57**(2): 125–130.

Hsu S M, Raine L, Franger H, 1981. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem. Cytochem.*, **29**(5): 577–584.

Keith I M, Will J A, 1982. Dynamics of the neuroendocrine cell-regulatory peptide system in the lung. Specific overview and new results. *Exp. Lung. Res.*, **3**(2): 387–402.

Keith I M, Ekman R, 1988. Calcitonin gene-related peptide in hamster lung and its coexistence with serotonin: a chemical and immunocytochemical study. *Regul. Pept.*, **22**: 315–323.

Keith I M, Ekman R, 1990. Peptide YY-like material and its spatial relationship with NPY, CGRP and 5-HT in the lung of the Syrian golden hamster. *Cell Tissue Res.*, **262**: 543–550.

Keith I M, Pelto-Huikko M, Schalling M *et al*, 1991. Calcitonin gene-related peptide and its mRNA in pulmonary neuroendocrine cells and ganglia. *Histochemistry*, **96**: 311–315

Martling C-R, Saria A, Fischer J A, 1988. Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal co-existence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul. Pept.*, **20**: 125–139.

Schifter S, Johannsen L, Bunker C *et al*, 1993. Calcitonin gene-related peptide in small cell lung carcinomas. *Clinical Endocrinology*, **39**: 59–65.

Tjen-A-Looi S, Keith I M, Lippton H, 1991. CGRP, SOM-14, SOM-28 and their antagonists modulate hypoxic pulmonary hypertension in rats (abstract 6160). *FASEBJ*, **5**: A1432.

Uddman R, Luts A, Sundler F, 1985. Occurrence and distribution of calcitonin gene-related peptide in the mammalian respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.*, **241**: 551–555.

Zzyzik-Krzeska M F, Bayliss D A, Seroogy K B *et al*, 1991. Gene expression for peptides in neurons of the petrosal and nodose ganglia in rat. *Exp Brain Res.*, **83**: 411–418.

STUDIES ON IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND *IN SITU* HYBRIDIZATION OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE AND ITS mRNA IN LUNGS OF *Macaca mulatta*

ZHANG Yuan-qiang WU Sheng-xi

(Department of Histology and Embryology, Department of Anatomy,

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

XU Ruo-jun ZHANG Shu-hua

(Department of Zoology, University of Hong Kong, Hong Kong)

Abstract

The occurrence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its mRNA was studied in lungs of *Macaca mulatta* using ABC-GDN immunohistochemistry and *in situ* hybridi-

zation. The results demonstrated that CGRP was located in neuroendocrine cells (NEC) and neuroepithelial bodies (NEB), including all airways from bronchi, bronchioles and alveolar ducts. The distribution of CGRP hybridization positive cells was similar to that previously discribed with immunohistochemistry. Labelling for CGRP mRNA was evenly distributed over the cytoplasm, whereas CGRP was usually of high intensity toward the base of neuroendocrine cells, suggesting basal accumulation of synthesized peptide. The nerve fibers in walls of the intrapulmonary bronchi and blood vessels were also CGRP positive. Adjacent sections immunostained with antibodies to CGRP and 5-hydroxytryptamin (5-HT) proved the coexistance of CGRP and 5-HT in NEC and NEB. This finding suggests the possibility of functional interaction of CGRP with 5-HT.

Key words Calcitonin gene-related peptide, 5-hydroxytryptamin, Immunohistochemistry, *In situ* hybridization, *Macaca mulatta*, Lung